

D E 6 8 9 0 5 3 7 3 (E P 0 3 4 2 1 0 0 B 1)

A b s t r a c t n o t a v a i l a b l e f o r D E 6 8 9 0 5 3 7 3 D

A b s t r a c t o f c o r r e s p o n d i n g d o c u m e n t: **US5165935**

A c o s m e t i c o r d e r m a t o l o g i c a l c o m p o s i t i o n  
c o m p r i s i n g a n e x t r a c t o f k o l a s e e d s  
s u b s t a n t i a l l y f r e e o f m e t h y l x a n t h i n e . O t h e r  
e m b o d i m e n t s i n c l u d e a c o m p o s i t i o n  
c o m p r i s i n g l i p o s o m e s o r h y d r a t e d l i p i d i c  
l a m e l l a r p h a s e s c o n t a i n i n g a n e x t r a c t o f k o l a  
s e e d s h a v i n g a m e t h y l x a n t h i n e c o n t e n t o r  
c o n t a i n i n g a n e x t r a c t o f k o l a s e e d s s u b s t a n t i a l l y  
f r e e o f m e t h y l x a n t h i n e . M e t h o d s f o r t r e a t i n g  
c e l l u l i t i s d e p o s i t s p r e s e n t o n b o d y p a r t s b y  
a p p l i c a t i o n o f t h e c o m p o s i t i o n s o f t h e p r e s e n t  
i n v e n t i o n a r e a l s o d i s c l o s e d .

**BEST AVAILABLE COPY**



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧⑦ EP 0 342 100 B1

⑩ DE 689 05 373 T 2

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**A 61 K 35/78**  
A 61 K 7/48

- |  |              |
|--|--------------|
| ②① Deutsches Aktenzeichen:   | 689 05 373.8 |
| ⑧⑥ Europäisches Aktenzeichen:  | 89 401 249.1 |
| ⑧⑥ Europäischer Anmeldetag:  | 3. 5. 89     |
| ⑧⑦ Erstveröffentlichung durch das EPA:                                   | 15. 11. 89   |
| ④⑥ Veröffentlichungstag der Patentansprüche<br>in deutscher Übersetzung: | 22. 3. 90    |
| ⑧⑦ Veröffentlichungstag<br>der Patenterteilung beim EPA:                 | 17. 3. 93    |
| ④⑦ Veröffentlichungstag im Patentblatt:                                  | 23. 9. 93    |

DE 689 05 373 T 2

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
10.05.88 FR 8806306

⑦③ Patentinhaber:  
Parfums Christian Dior, Paris, FR

⑦④ Vertreter:  
Beetz, R., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Timpe, W., Dr.-Ing.;  
Siegfried, J., Dipl.-Ing.; Schmitt-Fumian, W., Prof.  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Mayr, C.,  
Dipl.-Phys.Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 80538 München

⑧④ Benannte Vertragstaaten:  
AT, BE, CH, DE, ES, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

⑦② Erfinder:  
Andre, Patrice, F-45170 Neuville Aux Bois, FR;  
Dominice, Jocelyne, F-45160 Olivet, FR; Perrier,  
Pierre, F-45000 Orleans, FR; Redziniak, Gerard,  
F-45590 St Cyr en Val, FR

⑤④ Kosmetische oder dermatologische Anti-Zellulitis oder schlankmachende Zusammensetzung mit freien oder in liposomen Kolaextrakten.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 689 05 373 T 2

P 689 05 373.8-08

Die vorliegende Erfindung betrifft im wesentlichen eine kosmetische oder dermatologische Zusammensetzung, insbesondere mit schlankmachender oder Anti-Cellulitis-Wirkung, die Methylxanthin-freie Cola-Extrakte in freier Form oder in Form von Liposomen enthält.

Es sind bereits kosmetische Präparate in ziemlich großer Zahl gegenwärtig auf dem Markt, die zum Schlankmachen von Teilen der menschlichen Körperoberfläche bestimmt sind. Sie enthalten in vielen Fällen Produkte natürlichen Ursprungs, insbesondere pflanzlichen Ursprungs, wie z.B. Efeuextrakt, Coffein, Aescin etc. In der Literatur werden außerdem eine große Zahl schlankmachender Formulierungen genannt, von denen beispielsweise US-A-4 525 359 (Greenway III et al.) zu nennen ist, worin vorgeschlagen wird, als Wirkstoffe  $\beta$ -stimulierende Adrenergika, vorzugsweise Theophyllin, Isoproterenol, Forskolin und Epinephrin, zu verwenden. Desgleichen wurde in US-A-4 288 433 (Koulbanis et al.) schon früher die Anwendung von Methylxanthinen, insbesondere von Coffein, bei der Herstellung von schlankmachenden Produkten empfohlen, die für die lokale Anwendung an den zu behandelnden Stellen bestimmt sind.

Auf der anderen Seite erwies sich aber bis heute keine der auf den Markt gebrachten Formulierungen als zur Schlankmachung des Körpers sehr wirksam. Aus diesem Grund wird häufig empfohlen, diese Formulierungen in Kombination mit einem Abmagerungsprogramm oder einem Diätplan anzuwenden. Dies ist insbesondere der Fall bei US-A-4 525 359, wobei der Anwender bei festgestellter Abmagerung niemals sicher sein kann, ob diese durch das Abmagerungsprogramm bzw. den

Diätplan oder die schlankmachende Formulierung bedingt ist.

Daher wurden eine große Anzahl von Wirkstoffen zur Gewichtsreduktion von Rezeptur-Herstellern oder den Lieferanten vorgeschlagen.

Im besonderen sind in dem Dokument FR-A-2 499 405 eine schlankmachende kosmetische Zusammensetzung mit Anti-Cellulitis-Wirkung auf der Basis eines Pflanzenextrakts, der Saponine, einen Extrakt aus Arnica Montana L. und einen Extrakt aus Colanüssen enthält, sowie sein Anwendungsverfahren beschrieben.

Ebenso ist in dem Dokument FR-A-2 554 344 ferner eine kosmetische Zusammensetzung mit schlankmachender und Anti-Cellulitis-Wirkung beschrieben, die 0,5 bis 10 Gew.-% einer Purinbase natürlichen oder synthetischen Ursprungs, die vorzugsweise unter Extrakten aus Kaffee, Tee, Cola und Mate, Coffein und Theophyllin sowie ihren Derivaten, wie ihren Salzen und ihren Komplexen, ausgewählt ist, 0,5 bis 10 Gew.-% eines Extrakts aus Hedera Helix und 0,1 bis 10 Gew.-% eines Extrakts aus Ruscus aculeatus enthält.

Desgleichen wurden von der italienischen Gesellschaft Inverni Della Beffa Extrakte aus Colasamen vorgeschlagen, die insbesondere Methylxanthine, die Coffein, Theobromin, Theophyllin etc. umfassen, und Tanine, wegen ihrer adstringierenden, aromatisierenden und lipaseaktivierenden Eigenschaften, enthalten. Von dieser Gesellschaft wurden zwei spezielle Extrakte angegeben, nämlich trockener Cola-Extrakt, der auch als "Extrakt 14" bezeichnet wird, da er einen als Coffein ausgedrückten Alkaloidgehalt von 14 % aufweist, dessen empfohlene Zusatzmenge bis zu 1 % beträgt.

Der zweite Extrakt ist flüssiger Cola-Extrakt Lipa, auch als "Lipa-Extrakt" bezeichnet, dessen als Coffein ausgedrückter Alkaloidgehalt  $\leq 0,5$  ‰ beträgt.

Da der Lipa-Extrakt praktisch alkaloidfrei ist und die schlankmachenden Eigenschaften bisher den Methylxanthinen, insbesondere dem Coffein, zugeschrieben wurden, eignet sich dieser Lipa-Extrakt exklusiv zur Herstellung von adstringierenden Zusammensetzungen mit einem Gehalt von bis zu 5 %.

Eingehende Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurden, erlaubten die völlig überraschende Feststellung, daß im wesentlichen Methylxanthin-freie Cola-Extrakte, und insbesondere der oben genannte Lipa-Extrakt, hinsichtlich der Lipolyse ebenso wirksam sind wie Methylxanthine enthaltender Cola-Extrakt, insbesondere der Extrakt 14, wobei die lipolytische Wirksamkeit nach dem Adipocytenmodell in Kultur bestimmt wurde.

So wurde von den Erfindern, die sich über das im Stand der Technik anerkannte Vorurteil in Bezug auf das Fehlen einer Wirksamkeit bzw. die Unwirksamkeit von Methylxanthin-freien Produkten, wie z.B. von im wesentlichen Methylxanthin-freien Cola-Extrakten wie Lipa-Extrakt, bei der Behandlung von lokaler Cellulitis oder Adipositas hinwegsetzten, festgestellt, daß die im wesentlichen Methylxanthin-freien Cola-Extrakte mindestens ebenso wirksam sind wie die Methylxanthine enthaltenden Cola-Extrakte, wie z.B. Extrakt 14.

Darüber hinaus wurde von den Erfindern, welche die Wirksamkeit dieser beiden Extrakte, d.h. Extrakt 14 und Lipa-Extrakt, auf die Aktivität von Adipocyten in Kultur unter-

suchten, in ebenfalls völlig unerwarteter Weise festgestellt, daß diese Extrakte, wenn sie in Liposomen eingekapselt waren, eine gegenüber den freien, d.h. nicht in Liposomen eingekapselten Extrakten eine extrem höhere Wirksamkeit aufwiesen.

Demzufolge gibt die vorliegende Erfindung, nach einem ersten Aspekt, eine kosmetische oder dermatologische Zusammensetzung, insbesondere mit schlankmachender oder Anti-Cellulitis-Wirkung, an, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie im wesentlichen Methylxanthin-freie Extrakte aus Colasamen oder solche Extrakte aus Colasamen enthaltende wasserhaltige lamellare Lipidphasen oder Liposomen enthält.

Nach einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die Extrakte aus Colasamen im wesentlichen Methylxanthin-freie Extrakte mit einem Methylxanthingehalt unterhalb etwa 0,5 ‰.

Nach einer anderen besonderen Ausführungsform ist die Colapflanze, aus der die erfindungsgemäßen Extrakte erhalten werden, die Pflanze Cola Nitida oder die Pflanze Cola Vera Shum.

Die erfindungsgemäß verwendbaren Extraktionsverfahren sind dem Fachmann geläufige Verfahren, bei denen beispielsweise organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische, wie beispielsweise Wasser-Alkohol-Gemische, eingesetzt werden.

So können beispielsweise Gesamtextrakte aus Colasamen gemäß der Erfindung unter Anwendung des in FR-A-2 586 532 beschriebenen Verfahrens erhalten werden, das wie folgt leicht modifiziert wurde.

Die Samen oder Nüsse der Colapflanze werden zerkleinert und anschließend einer Extraktionsbehandlung mit einem Methanol/Wasser-Gemisch oder einem Ethanol/Wasser-Gemisch von 40 bis 50 % unterzogen. Der wäßrig-alkoholische Extrakt wird gewonnen, aus dem dann der Alkohol durch Verdampfen abgetrennt wird.

Die so erhaltene wäßrige Lösung wird dann durch Zerstäuben oder Lyophilisierung getrocknet und danach zerkleinert, wobei ein stabiler Gesamtextrakt erhalten wird. Dieser Gesamtextrakt kann als solcher als Gesamtextrakt gemäß der Erfindung verwendet werden.

Nach einer anderen besonderen Ausführungsform der Erfindung werden die im wesentlichen Methylxanthin-freien Extrakte von Colasamen gemäß der Erfindung nach einem beliebigen Extraktionsverfahren erhalten, mit dem die Methylxanthine im wesentlichen vollständig abgetrennt werden können.

Auf diese Weise ist es möglich, ausgehend von der bei Durchführung des oben beschriebenen Verfahrens erhaltenen wäßrigen Lösung, erfindungsgemäß durch Behandlung mit einem selektiven Lösungsmittel für Coffein, wie einem chlorierten Lösungsmittel wie Dichlormethan, Chloroform oder Trichlorethan, oder einem anderen Lösungsmittel allein oder mit einer Kombination, wie in US-A-4 279 937 oder EP-B-101 135 angegeben, d.h. Benzylalkohol, Methyl-ethylketon oder Methylacetat, einen Extrakt herzustellen, der im wesentlichen Methylxanthin-frei und insbesondere im wesentlichen coffeinfrei ist.

Es kann ferner auch das in der Druckschrift US-A-4 279 937 (Procter) beschriebene Verfahren, das auf Colanüsse an-

wendbar ist, herangezogen werden, wobei ein Gemisch von Benzylalkohol mit einem anderen Lösungsmittel, wie Xylol, Ethylacetat, Cyclopentan, Cyclohexan, verwendet wird.

Nach einer Ausführungsvariante werden die Methylxanthine und insbesondere das Coffein in einem ersten Schritt allein extrahiert, wobei von Colasamen ausgegangen wird, die vorzugsweise vorher zerkleinert wurden. Anschließend werden die entcoffeinierten Samen nach einem herkömmlichen Verfahren, beispielsweise nach dem oben beschriebenen Verfahren, extrahiert, wobei dann der Gesamtextrakt erhalten wird.

In der Literatur sind mehrere Verfahren zur Extraktion von Coffein und damit von Methylxanthinen beschrieben. So ist beispielsweise in der Zeitschrift Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan 59, No. 9 (1985), Seiten 917-919, ein Verfahren zur selektiven Extraktion von Coffein mit heißem Wasser beschrieben, bei dem intakte Teeblätter eingesetzt werden und das sich direkt zur Extraktion der Methylxanthine in Wasser eignet. Dieses Verfahren erlaubt bei Anwendung auf zerkleinerte Colanüsse die Herstellung von entcoffeinierten Colasamen.

Die Methylxanthine können ferner auch durch Anwendung eines Extraktionsverfahrens abgetrennt werden, bei dem ein Gas, wie z.B. Kohlendioxid, in überkritischem Zustand verwendet wird, wie beispielsweise in Food Technology (Chicago) 40, No. 7 (1986) Seiten 57-64, sowie in Journal of Food Sciences and Technology 23, No. 6 (1986), Seiten 326-328, beschrieben ist.

In den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann der Gewichtsanteil der Cola-Extrakte in Bezug auf das Gesamtge-



wicht der Zusammensetzung innerhalb weiter Grenzen variieren. Die bevorzugten Mengenanteile liegen im Bereich zwischen 0,01 und 10 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der kosmetischen oder dermatologischen Zusammensetzung.

Das Einbringen der oben erläuterten Extrakte aus Colasamen in wasserhaltige lamellare Lipidphasen oder Liposomen kann nach einem beliebigen bekannten Verfahren vorgenommen werden. Diese Verfahren werden insbesondere in Abhängigkeit vom mehr oder weniger lipophilen oder mehr oder weniger hydrophilen Charakter der einzubringenden Extrakte ausgewählt.

Nach einem bevorzugten Einbringungsverfahren wird ein in EP-B1-0 087 993 beschriebenes Verfahren gewählt, ggfs. in Kombination mit einem in EP-B1-0 107 159 beschriebenen Verfahren.

Auf diese Weise ist es beispielsweise möglich, die oben genannten Extrakte aus Colasamen in lamellaren wasserhaltigen Lipidphasen oder Liposomen einzuschließen.

In der vorliegenden Beschreibung sowie den Ansprüchen wird unter dem Begriff "Lipidphase" des Begriffes "lamellare Lipidphase" jede Substanz verstanden, die eine Fettsäure-Kohlenstoffkette, allgemein mit mehr als 5 Kohlenstoffatomen, aufweist, wobei diese Substanz üblicherweise als "Lipid" bezeichnet wird.

Erfindungsgemäß werden als Lipide zur Herstellung der genannten Liposomen oder der lamellaren Lipidphasen amphiphile Lipide verwendet, d.h. Substanzen, die aus Molekülen bestehen, die eine ionische oder nichtionische hydrophile Gruppe sowie eine lipophile Gruppe aufweisen, wobei diese

amphiphilen Lipide in der Lage sind, in Gegenwart einer wäßrigen Phase lamellare Lipidphasen auszubilden.

Im einzelnen können als Beispiele hierfür genannt werden: Phospholipide, Phosphoaminolipide, Glycolipide, polyethoxylierte Fettalkohole sowie Ester von ggfs. polyethoxylierten Polyolen. Derartige Substanzen bestehen beispielsweise aus einem Lecithin aus Ei oder Soja, einem Phosphatidylserin, einem Sphingomyelin, einem Cerebrosid oder einem Stearat eines ethoxylierten Polyglycerins. Diese wasserhaltigen lamellaren Lipidphasen oder die Liposomen können in folgender Weise hergestellt werden:

#### Stufe 1

In einem organischen Lösungsmittel mit einem bei Atmosphärendruck relativ niederen Siedepunkt, beispielsweise unter 100 °C, wie z.B. Dichlormethan oder Methanol, wird ein amphiphiles Lipid, beispielsweise Sojalecithin, das ggfs. hydriert ist, gelöst. Ferner können ein hydrophobes Lipid, z.B. ein Sterin wie Cholesterin oder  $\beta$ -Sitosterin, und vorteilhaft ein Antioxidans, wie  $\alpha$ -Tocopherol, gelöst werden.

Die Menge an hydrophoben Lipiden sollte allgemein nicht mehr als die 0,2-fache Gewichtsmenge der amphiphilen Lipide betragen.

#### Stufe 2

Wenn die genannten Extrakte aus Colasamen in die Lipidphase eingebracht werden sollen, können solche Extrakte in der in Stufe 1 erhaltenen Lösung gelöst werden. Wenn eine Fraktion der Extrakte nicht solubilisierbar ist, wird die-

se unlösliche Fraktion durch Filtration abgetrennt. Die relativen Mengen an Lipiden einerseits und Extrakten andererseits, die als Wirkstoffe verwendet werden, können beispielsweise im Gewichtsverhältnissbereich von 8:2 bis 9,9:0,1 liegen. Das Gemisch wird vorzugsweise 30 min bei gewöhnlicher Temperatur gerührt.

#### Stufe 2a

Wenn die genannten Extrakte aus Colasamen in der wäßrigen Phase im Inneren der wasserhaltigen lamellaren Lipidphasen eingekapselt werden sollen, werden die genannten Extrakte nicht gemäß der oben genannten Stufe 2 behandelt, sondern in Wasser und vorzugsweise einer geeigneten wäßrigen Lösung wie beispielsweise einer Pufferlösung vom Typ einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gelöst.

#### Stufe 3-A

Das nach Stufe 1 oder Stufe 2 erhaltene Gemisch wird in einen rotierenden Kolben gegeben und unter Erhitzen in einem Wasserbad, ggfs. unter vermindertem Druck, eingedampft.

Nach Verdampfen des organischen Lösungsmittels wird der auf den Wänden abgeschiedene Lipidfilm unter Rühren mit Wasser oder einer geeigneten wäßrigen Lösung wie einer PBS-Pufferlösung wieder aufgenommen.

Wenn das direkt in Stufe 1 ohne Durchlaufen der Stufe 2 erhaltene Gemisch verwendet werden soll, wird die nach Stufe 2a erhaltene Lösung eingesetzt.

Die Menge an Wasser oder wäßriger Lösung ist vorzugsweise mindestens gleich der 8-fachen Gewichtsmenge der im Kolben enthaltenen Lipidmenge.

Man erhält so eine Suspension von Liposomen, die anschließend durch geeignete Mittel, beispielsweise durch Ultraschall, homogenisiert werden kann.

### Stufe 3-B

Nach einer Variante des Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, welche die genannten Extrakte enthalten, die in wasserhaltige lamellare Lipidphasen oder Liposomen eingebracht sind, wird das in EP-B1-0 087 993 beschriebene Verfahren angewandt, das die Zerstäubung des am Ende der Stufe 1 oder der Stufe 2 erhaltenen Gemischs und die anschließende Dispergierung des so erhaltenen Lipidpulvers in einer vorbestimmten Menge Wasser oder einer wäßrigen Lösung der einzukapselnden Substanzen, insbesondere der in Stufe 2a erhaltenen Lösung, umfaßt. Man erhält so wenig Wasser enthaltende lamellare Lipidphasen oder eine Suspension von Liposomen, je nachdem, ob das Lipidpulver in einer geringen oder einer großen Menge des wäßrigen Mediums dispergiert wird, wie in der genannten EP-Anmeldung erläutert ist.

Die Dispersion von wasserhaltigen lamellaren Lipidphasen oder Liposomen kann anschließend homogenisiert werden, beispielsweise nach dem in EP-B1-0 107 559 beschriebenen Verfahren.

#### Stufe 4 (gegebenenfalls durchgeführt)

Die Dispersion der wasserhaltigen lamellaren Lipidphasen oder die Suspensionen von Liposomen, die in den oben genannten Stufen 3-A oder 3-B erhalten werden, können geliert werden, beispielsweise durch Vermischen mit einem separat hergestellten Gel, wie z.B. einem Vinylpolymergel.

Weitere Ziele, Eigenschaften und Vorteile der Erfindung gehen aus den Erläuterungen der folgenden Beschreibung hervor, die sich auf mehrere Ausführungsbeispiele bezieht, wobei die Angaben den Umfang der vorliegenden Erfindung in keiner Weise einschränken. In diesen Beispielen sind die Prozentangaben, wenn nichts anderes angegeben ist, gewichtsbezogen.

#### Beispiel 1

##### **Herstellung einer einfachen Zusammensetzung auf der Basis von Colasamen-Extrakten**

Als Ausgangsmaterial werden Extrakte von Colasamen eingesetzt, die unter der Bezeichnung flüssiger Cola-Extrakt Lipa von der italienischen Gesellschaft Inverni Della Beffa im Handel sind und einen als Coffein ausgedrückten Alkaloidgehalt von  $\leq 0,5$  ‰ enthalten; sie sind im folgenden kurz als Cola Lipa bezeichnet.

Aus diesem Extrakt werden erfindungsgemäße Zusammensetzungen mit verschiedenen Mengen an Cola Lipa von 0,1 %, 0,5 % und 2 % durch Lösen dieses Extrakts in einer wäßrigen Phosphatpufferlösung oder PBS-Lösung hergestellt. Nach dem Lösen wird die erhaltene Lösung über ein 0,8 µm-Filter filtriert, um unlösliche Substanzen abzutrennen.

Man erhält so erfindungsgemäße Zusammensetzungen, die als solche verwendet werden können, insbesondere für die Wirksamkeitsuntersuchungen, die weiter unten beschrieben sind.

Zu Vergleichszwecken werden ferner Vergleichszusammensetzungen auf der Basis des Handelsprodukts der gleichen italienischen Gesellschaft Inverni Della Beffa hergestellt, das als trockener Cola-Extrakt bezeichnet ist und einen als Coffein ausgedrückten Alkaloidgehalt von etwa 14 % enthält; dieser Extrakt wird kurz als Cola 14 bezeichnet.

Mit diesem Cola 14-Extrakt werden in gleicher Weise wie oben Lösungen mit einem Gehalt von 0,1 %, 0,5 % und 2 % hergestellt.

### Beispiel 2

**Erfindungsgemäße Liposomen-Zusammensetzung, die einen im wesentlichen Methylxanthin-freien Extrakt aus Colasamen enthält**

Hierzu können ebenfalls verschiedene Zusammensetzungen mit verschiedenen Extraktgehalten von 0,1 %, 0,5 % und 2 % in Form von Liposomen in folgender Weise hergestellt werden:

Hierzu kann von Lösungen ausgegangen werden, die Cola Lipa in der in Beispiel 1 hergestellten wäßrigen Lösung enthalten und die mit 1 % des Lipidpulvers versetzt werden, das nach dem in EP-B1-0 087 993 beschriebenen Zerstäubungsverfahren erhalten wurde, das in der oben angegebenen Stufe 3-B kurz beschrieben ist, und das 9 Teile hydriertes natürliches Sojalecithin auf 1 Teil  $\beta$ -Sitosterin enthält.

Das Lipidpulver wird unter Rühren mit einem Magnetrührer in der wäßrigen Lösung dispergiert, bis eine homogene Suspension erhalten wird.

Anschließend werden diese Lösungen, z.B. unter Verwendung eines Ultraschallgeräts mit der Bezeichnung LABSONIC 1510, 7 min bei 200 W und 4 °C mit Ultraschall behandelt, um Liposomen herzustellen, deren Größe, aufgrund der Bestimmung mit einem Nanosizer<sup>(R)</sup> (Coultronic) 100 bis 150 nm beträgt.

Durch diese Verfahrensweise erhält man so erfindungsgemäße Liposomen-Zusammensetzungen, die 0,1 %, 0,5 % bzw. 2 % (gewichtsbezogen) Cola Lipa enthalten, die als solche zur Herstellung kosmetischer oder dermatologischer Zusammensetzungen oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen und/oder Excipientien, wie später erläutert werden wird, verwendet werden können. Die Untersuchung der Wirksamkeit dieser Zusammensetzungen wird ebenfalls später erläutert.

### Beispiel 3

**Liposomen-Zusammensetzung, die Gesamtextrakte aus Colasamen enthält**

Es wird wie in Beispiel 2 verfahren, wobei jedoch die in Beispiel 1-B hergestellten wäßrigen Lösungen eingesetzt werden, die anstelle von Cola Lipa den Cola 14-Extrakt enthalten.

Man erhält so Liposomen-Zusammensetzungen mit einem Gehalt an Cola 14 von 0,1 %, 0,5 % bzw. 2 %. Diese Zusammensetzungen können ebenfalls als solche zur Herstellung kosmetischer oder pharmazeutischer Zusammensetzungen und insbe-

sondere dermatologischer Zusammensetzungen herangezogen oder durch Zusatz weiterer Wirkstoffe und/oder von Excipientien vervollständigt werden, wie später erläutert wird. Diese Zusammensetzungen werden ferner als solche zur Untersuchung ihrer Wirksamkeit eingesetzt.

#### Beispiel 4

##### **Nachweis der lipolytischen Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen**

##### **- Ermittlung der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen an Adipocyten in Kultur**

Zur Ermittlung der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen als lipolytische Mittel wurde der Test an einer Zelllinie muriner Präadipocyten, wie z.B. einer Zelllinie 3T3 L1, ausgewählt, die von der Gesellschaft Flow Laboratories im Handel erhältlich ist; diese Präadipocyten wurden wegen ihrer Fähigkeit ausgewählt, sich in Adipocyten umzuwandeln, wenn dies die Kulturbedingungen erlauben.

(Gemäß dem Verfahren von Green, H., Kehinde, C., Cell 1 (1974) 113).

Diese Zelllinie stellt in der Tat ein Modell zur Untersuchung der adipocytären Differenzierung in vitro dar und bietet die Möglichkeit, wenn der adipocytäre Phänotyp erreicht ist, die Regelungen der Zellfunktion in Abhängigkeit von der extrazellulären Umgebung zu untersuchen. Diese Differenzierung und ihre Modulation wird von einer gewissen Anzahl morphologischer und biochemischer Veränderungen begleitet, insbesondere von biochemischen Veränderungen, welche die Freisetzung von Glycerin betreffen.



Es ist entsprechend bequem, die lipolytische Wirksamkeit der zu testenden Verbindungen durch eine Bestimmung des im Kulturmedium nach mehreren Tagen Behandlung freigesetzten Glycerins zu verifizieren.

Diese Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

#### 1) Kulturbedingungen

Die Präadipocyten werden in Petrischalen von 35 mm Durchmesser in Gegenwart von DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") geimpft (20000 Zellen/Schale), das 10 % Kälberfetalserum und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) enthält.

Das Medium wird alle 2 bis 3 Tage erneuert.

Unter diesen Bedingungen erreicht die Kultur innerhalb einer Woche Konfluenz ( $J = J_0$ ); in diesem Stadium wird die Adipocyten-Differenzierung durch Zusatz von Insulin in einer Konzentration von  $5 > \text{g/ml}$  zum Kulturmedium aktiviert.

Diese Zellen stellen eine Woche nach der Konfluenz ( $J = J_7$ ) einen fortgeschrittenen differenzierten Zustand dar.

#### 2) Behandlung - Lebensfähigkeit

Die Zellen werden im Stadium  $J_7$  mit den zu untersuchenden Produkten behandelt.

Diese Behandlung besteht in einem Ersatz des Kulturmediums entweder durch vollständiges Medium zu Vergleichszwecken oder durch das gleiche Medium, welches das zu untersuchende Produkt in verschiedenen Konzentrationen enthält.

Zur quantitativen Bestimmung des freigesetzten Glycerins wird das Kulturmedium 24 h bis 7 d nach der Behandlung gewonnen.

Das Medium, das ggfs. das zu untersuchende Produkt enthält, wird alle 2 bis 3 d erneuert.

Die Nichttoxizität der Produkte gegenüber den Zellen in Kultur wurde durch Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach dem Verfahren von Bradford sichergestellt, das von M.M. Bradford (Analytical Biochemistry 72 (1976) 248-254) beschrieben wurde und in einem Abbau mit 0,5 N Natriumhydroxid und Färbung mit Coomassie-Blau besteht. Die Stärke der Lipolyse wird dann durch Biolumineszenzmessung des im Kulturmedium freigesetzten Glycerins gemessen.

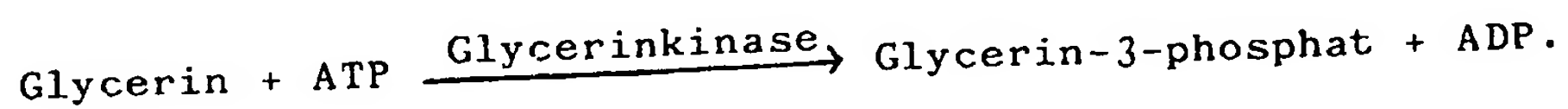
### 3) Quantitative Bestimmung des im Kulturmedium freigesetzten Glycerins durch Biolumineszenzmessung

Die Kulturmedien der Vergleichsversuche bzw. der behandelten Versuche werden 2 bis 7 d nach der Behandlung gewonnen.

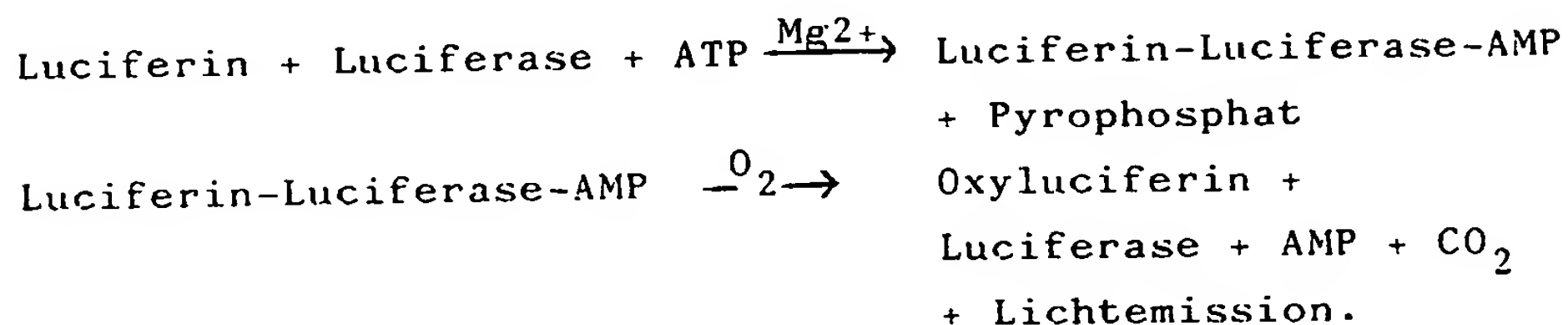
Die Überstände können vor der quantitativen Bestimmung bei -20 °C gelagert werden.

Die Glycerinbestimmung wird wie folgt durchgeführt:

Das Glycerin wird durch Umsetzung mit ATP in Gegenwart des Enzyms Glycerinkinase nach folgender Reaktion bestimmt:



Der ATP-Überschuß wird, sobald er auftritt, durch Biolumineszenz in Gegenwart des Luciferin-Luciferase-Komplexes nach folgender Reaktion bestimmt:



Die Lichtemission wird mit einem Photomultiplier erfaßt, beispielsweise einem Biocounter Lumac<sup>®</sup> 3 M.

Beim Mischen der Reaktanten tritt sofort maximale Lichtemission auf. Die eigentliche Bestimmung geschieht in folgender Weise:

a) Herstellung von ATP

Es wird eine Lösung von ATP, bezogen von Sigma, einer Konzentration von 50  $\mu$ M in einer 0,2 mM-Lösung von  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  hergestellt.

Das ATP wird auf -20 °C eingefroren und zur Verwendung vorsichtig aufgetaut und bei 0 °C (in Eis) und im Dunkeln aufbewahrt.

b) Herstellung der Proben

Es werden Glycerin-Eichlösungen im Konzentrationsbereich von 0,25, 0,50, 0,75 und 1 mM in einem Puffer aus Citronensäure/NaOH 0,1 M, pH 7, hergestellt.

Die quantitative Bestimmung des im Kulturmedium vorliegenden Glycerins erfolgt nach Einfrieren und vorsichtigem Auftauen des Mediums. Die Verdünnung wird so gewählt, daß die Konzentration im Bereich von 0,20 bis 0,90 nmol pro ml Reaktionsvolumen liegt.

Es werden drei Versuche pro Probe durchgeführt.

c) Bestimmungsverfahren

In eine Meßküvette werden 10 µl ATP 50 µM und anschließend 20 µl Glycerinkinase (erhältlich von Boehringer, Mannheim), die vorzugsweise gereinigt ist, sowie 770 µl Pufferlösung aus Citronensäure/NaOH 0,1 M, pH 7, gegeben.

Danach werden 100 µl Glycerinlösung (Eichbereich) oder geeignet verdünntes Kulturmedium hinzugefügt.

Anschließend wird 10 s kräftig gerührt. Danach wird 4 min bei 20 bis 22 °C im Dunkeln inkubiert.

Anschließend werden 100 µl Luciferin-Luciferase (NRB/Lumi PM-Kit zum Lumac 3 M) mit der Pumpe des Geräts Biocounter Lumac 3 M eingespritzt.

Man integriert während 60 s.

Es werden drei Versuche pro Probe durchgeführt.

d) Mathematische Angabe der Ergebnisse

Zwischen dem emittierten Licht  $y$  und der Konzentration  $x$  an Glycerin wird eine Regression nach dem Verfahren der kleinsten Quadrate durchgeführt. Dabei stützt man sich auf

zwei Kriterien zur Auswahl der Gleichung: Den Bestimmungskoeffizienten  $R^2$  und den Standardfehler der Regression (entspricht dem Hintergrundrauschen des Versuchs).

Die Polynomform ist zur Beschreibung dieses Phänomens am besten geeignet. Dabei enthalten lediglich die Terme der beiden ersten Ordnungen eine reelle Information.

Dementsprechend wird nur eine Gleichung zweiter Ordnung aufgestellt, welche die Änderung des emittierten Lichts  $y$  in Abhängigkeit von der Konzentration  $x$  an Glycerin in folgender Form wiedergibt:

$$y = a - bx + cx^2.$$

Der Bestimmungskoeffizient der Eichkurve muß über 90 % betragen, damit der entsprechende Bereich als gültig angesehen werden kann.

Der Variationskoeffizient für jede Konzentration des durch Biolumineszenzmessung erhaltenen Eichbereichs ist kleiner als 5 %.

#### e) Ergebnisse

Durch Biolumineszenzmessung wird das Glycerin nach 2 und 7 Tagen Behandlung mit den Extrakten Cola 14 und Cola Lipa bei einer Konzentration von 1 mg/l in freiem Zustand, wie in Beispiel 1 beschrieben, und in Form von Liposomen, wie in den Beispielen 2 und 3 beschrieben, quantitativ bestimmt.

Für jede von drei unter gleichen Bedingungen erzeugten Kulturen entnommene Probe werden drei Versuche durchgeführt.

Es werden folgende Ergebnisse erhalten:

Resultate

nach 2 Tagen Behandlung

	Wirkstoffe allein			Wirkstoffe in Liposomen			
	Ver- gleich	Cola 14	Cola Lipa	Liposomen Blank (Ver- gleich)	Liposomen Cola 14	Liposomen Cola Lipa	
Glycerin $\mu\text{mol/ml}$ Kulturmedium	0,79	1,34	1,62	1,80	2,70	3,90	
	0,59	1,19	0,81	1,04	3,80	6,37	
	0,96	0,71	1,25	0,52	0,90	1,24	
Mittelwert $\mu\text{mol/ml}$	0,78	1,08	1,23	1,12	2,46	3,83	
$\sigma$	0,19	0,33	0,41	0,64	1,46	2,57	
% bezogen auf Glycerin	100	138	158	100	220	342	

nach 7 Tagen Behandlung

	Wirkstoffe allein			Wirkstoffe in Liposomen		
	Ver- gleich	Cola 14	Cola Lipa	Liposomen Blank (Ver- gleich)	Liposomen Cola 14	Liposomen Cola Lipa
Glycerin $\mu\text{mol/ml}$ Kulturmedium	1,36	1,48	1,20	1,76	3,45	4,20
	0,88	1,18	1,34	1,65	4,80	5,90
	0,75	0,94	1,48	0,76	4,20	4,90
Mittelwert $\mu\text{mol/ml}$	1,00	1,20	1,34	1,39	4,15	5,00
$\sigma$	0,32	0,27	0,14	0,55	0,68	0,85
% bezogen auf Glycerin	100	120	134	100	299	360

Dementsprechend ist in gänzlich unerwarteter Weise festzustellen, daß die Extrakte von Cola Lipa, die im wesentlichen frei von Methylxanthinen sind, ebenso wirksam sind wie die Extrakte von Cola 14, die 14 % Methylxanthine enthalten, während die lipolytische Wirksamkeit bisher ausschließlich den Methylxanthinen zugeschrieben wurde.

Darüber hinaus ist festzustellen, daß die Cola Lipa-Extrakte sogar eine geringfügig höhere lipolytische Wirksamkeit aufweisen als die Cola 14-Extrakte.

Schließlich besitzen die freien Extrakte von Cola Lipa oder Cola 14, d.h. die nicht in Liposomen eingeschlossenen Extrakte, eine relativ geringe lipolytische Wirksamkeit, während diese Wirksamkeit bei Vorliegen in Form von Liposomen außerordentlich stark erhöht ist, wobei diese Erhöhung der Wirksamkeit noch signifikanter und noch abrupter bei dem Extrakt Cola Lipa auftritt, der im wesentlichen frei von Methylxanthinen ist, was, sogar in Bezug auf die nicht in Liposomen eingeschlossene Form, gänzlich überraschend ist.

Im folgenden werden verschiedene Beispiele für Formulierungen von kosmetischen oder pharmazeutischen und insbesondere dermatologischen Zusammensetzungen angegeben.

### Beispiel 5

#### Schlankmachende kosmetische Creme

Durch einfaches Mischen der nachstehend aufgeführten Komponenten in den im folgenden angegebenen Gramm-Mengen wird eine Creme hergestellt:

Flüssiger Cola-Extrakt Lipa	0,5 g
Phosphatpuffer	29,5 g
Stabilisierte W/O-Emulsion	<u>70,0 g</u>
	100,0 g .

Die so erhaltene Creme wird im Verlauf einer Kur von 1 bis 3 Wochen ein- bis zweimal täglich auf die zu behandelnden Körperteile aufgetragen.

### Beispiel 6

#### Schlankmachendes dermatologisches Gel mit Liposomen

Durch Einkapseln des flüssigen Cola-Extrakts Lipa wird gemäß Beispiel 2 eine Liposomen-Suspension hergestellt. Diese Suspension wird anschließend mit einem getrennt hergestellten neutralisierten Gel aus Carbopol 940<sup>®</sup> gemischt.

Man erhält so folgende Gelzusammensetzung:

Sojalecithin	1,0 g
ß-Sitosterin	0,1 g
Flüssiger Cola-Extrakt Lipa	1,0 g
Carbopol 940 <sup>®</sup>	0,4 g
Durch Konservierungsmittel und Antioxidantien stabilisierte wäßri- ge Excipientien	ad 100 g.



Diese Präparation ermöglicht es bei täglichem Auftragen auf Taille, Schenkel und Hüften, eine merkliche Verringerung der Cellulitis innerhalb eines Zeitraums von 1 bis 3 Wochen zu erzielen.

P 689 05 373.8-08

Patentansprüche für die Vertragsstaaten AT, BE, CH, DE, GB, IT, LI, NL, SE:

1. Kosmetische oder dermatologische Zusammensetzung, insbesondere mit schlankmachender oder Antizellulitis-Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen Methylxanthin-freie Extrakte aus Colasamen oder solche Extrakte aus Colasamen enthaltende wasserhaltige lamellare Lipidphasen oder Liposome enthält.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Extrakte aus Colasamen im wesentlichen Methylxanthin-freie Extrakte aus Colasamen mit einem Methylxanthingehalt von unter etwa 0,5 Promille sind.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Cola, aus dem die erfindungsgemäßen Extrakte erhalten werden, die Pflanze Cola Nitida oder die Pflanze Cola Vera Schum ist.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die im wesentlichen Methylxanthin-freien Extrakte aus Colasamen mittels jedem geeigneten Extraktionsverfahren, bei dem die Methylxanthine im wesentlichen vollständig entfernt werden können, erhalten sind.
5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die im wesentlichen Methylxanthin-freien Extrakte aus Colasamen aus einem Gesamtextrakt erhalten sind, von dem das Methylxanthin mit einem selektiven Lösungsmittel entfernt wird.
6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Gewichtsanteil des Extraktes zwischen 0,01 und 10 Gew.%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung, beträgt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**